

WEST

Generate Collection

Print

L8: Entry 1 of 2

File: JPAB

Sep 13, 1990

PUB-NO: JP402231075A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 02231075 A

TITLE: SUPEROXIDE DISMUTASE MODIFIED WITH DEXTRAN SULFATE

PUBN-DATE: September 13, 1990

INVENTOR-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

UENO, HITOSHI

MOTOYUKI, CHISATO

OKANARI, EIJI

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

UBE IND LTD

APPL-NO: JP01050002

APPL-DATE: March 3, 1989

US-CL-CURRENT: 435/189

INT-CL (IPC): C12N 9/02; A61K 37/50; A61K 37/50; A61K 37/50; A61K 37/50; A61K 37/50

ABSTRACT:

PURPOSE: To provide the subject enzyme modified with dextran sulfate, useful for the remedy of tissue damage caused by superoxide generated from O₂ in the living body and exhibiting excellent pharmacological effect as an intravenous injection because of its high retainability of enzymatic activity and long half-life in blood.

CONSTITUTION: The objective enzyme is a superoxide dismutase(SOD) modified with dextran sulfate preferably at a rate of 1-5 molecules of dextran sulfate per 1 molecule of SOD. The enzyme can be produced e.g. by reacting cyanuryl chloride to the hydroxyl group of dextran sulfate and bonding the chloride to the amino group of SOD via the triazine ring of the cyanuryl chloride.

COPYRIGHT: (C)1990,JPO&Japio

WEST

Generate Collection

Print

L4: Entry 17 of 33

File: DWPI

Sep 13, 1990

DERWENT-ACC-NO: 1990-324149

DERWENT-WEEK: 199043

COPYRIGHT 2002 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Superoxidedismutase modified by dextran sulphate - has high enzyme holding activity and longer half-life in blood circulation

PATENT-ASSIGNEE: UBE IND LTD (UBEI)

PRIORITY-DATA: 1989JP-0050002 (March 3, 1989)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
JP 02231075 A	September 13, 1990		000	

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DATE	APPL-NO	DESCRIPTOR
JP02231075A	March 3, 1989	1989JP-0050002	

INT-CL (IPC): A61K 37/50; C12N 9/02

ABSTRACTED-PUB-NO: JP02231075A

BASIC-ABSTRACT:

The SOD includes human SOD, cow SOD, spinage SOD, Ceratia SOD, etc.. The dextran sulphate has average mol. wt. of 8000. The ratio of SOD to dextran sulphate is 1-20, pref. 1-5 mols. of dextran sulphate per mol. of SOD.

The modified SOD is prepd., e.g., by reacting cyanuryl chloride with hydroxy gp. of dextran sulphate, and then reacting with amino gp. of SOD through triazine ring, or by introducing ester gp. into carboxylic gp. of dextran sulphate using N-hydroxy succinic acid and dicyclohexyl carbodiimide, and then reacting with amino gp. of SOD.

USE/ADVANTAGE - The superoxide dismutase deriv. shows high enzyme holding activity and longer half-life in blood circulation, and thus SOD activity can be increased. The modified SOD has about 90% enzyme holding activity and about 14 hrs. half-life in blood circulation.

ABSTRACTED-PUB-NO: JP02231075A

EQUIVALENT-ABSTRACTS:

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

DERWENT-CLASS: B04 D16

CPI-CODES: B04-B02C2; D05-C03B;

⑫ 公開特許公報(A)

平2-231075

⑮ Int. Cl.³C 12 N 9/02
// A 61 K 37/50

識別記号

ABE
ABC
ABL
ACA
AGZ

庁内整理番号

7823-4B
8615-4C

⑬ 公開 平成2年(1990)9月13日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全3頁)

⑭ 発明の名称 デキストラン硫酸修飾スーパーオキシドジスムターゼ

⑯ 特 願 平1-50002

⑰ 出 願 平1(1989)3月3日

⑱ 発 明 者 上 野 均 山口県宇部市大字小串1978番地の5 宇部興産株式会社宇部研究所内

⑲ 発 明 者 本 行 千 里 山口県宇部市大字小串1978番地の5 宇部興産株式会社宇部研究所内

⑳ 発 明 者 岡 成 栄 治 山口県宇部市大字小串1978番地の5 宇部興産株式会社宇部研究所内

㉑ 出 願 人 宇部興産株式会社 山口県宇部市西本町1丁目12番32号

明 細 書

1. 発明の名称

デキストラン硫酸修飾スーパーオキシドジスムターゼ

2. 特許請求の範囲

デキストラン硫酸で修飾されたスーパーオキシドジスムターゼ。

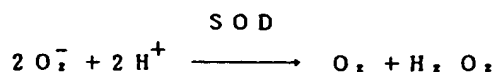
3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、生体内の酸素分子から発生したスーパーオキシド(O_2^-)による組織障害の治療に有用なデキストラン硫酸で修飾されたスーパーオキシドジスムターゼ(以下、SODと略す)に関するものである。

(従来技術の説明)

スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)は、下式に示す不均化反応によってスーパーオキシド(O_2^-)を消失させる作用を持つ酵素である。



従って、SODは、生体内で酸素分子から発生した O_2^- による組織障害、例えば、変形性関節炎、慢性関節リウマチ、放射線照射による障害、紫外線による障害、未熟児酸素網膜症、白内障、アドリアマイシンなどの抗癌剤の副作用、虚血部分への血流再開に伴う障害などに対する有効な治療薬として注目されている。

このようにSODが医薬として有望であるにもかかわらず、SODの血流内半減期が非常に短い(約5分)ために、その薬理活性が充分に発揮されない場合が多い。

SODの血流内半減期が非常に短い原因としては、その分子量(32,000)が腎糸球体の濾過限界値(分子量で約50,000)よりも小さいために血中から速やかに消失し、尿中に排泄されることが考えられている。

従って、SODの薬理活性を充分に発揮させるために、ポリエチレングリコール(Pyatok, P. S. et al.; Research Communications in Chem

al Pathology and Pharmacology, 29, 113 (1980))、ラットアルブミン (Wong, K. et al.; Agent and Actions, 10, 231 (1980))、フィコール (McCor d, J. M. et al.; Proceedings of National Academy of Sciences, U. S. A. 77, 1159 (1980))、ポリアルキレングリコール (特開昭61-249388) やイヌリン (特開昭58-32826) などを用いてSODを巨大分子化させ、SODの血中半減期を増加させる試みがなされている。

ところで、巨大分子化したSODを通常の静脈投与剤として使用する場合には、その血中半減期が長くなるのみならず、その酵素活性保持率が高く、かつ医薬としての安全性が高いことが望ましい。

しかしながら、これらの巨大分子化SODには、酵素活性保持率、血中半減期の長さ、抗原性およ

び医薬としての安全性に対して十分には満足できないという問題がある。

(発明が解決しようとする問題点)

本発明の目的は、生体内の酸素分子から発生した O_2^- による組織障害の治療に有用なSODと医薬として安全性が確認されているデキストラン硫酸とを結合させることによって得られた修飾SOD (以下、「修飾SOD」と略す) を提供するものである。

(問題点を解決するための手段)

本発明者らは、前記の問題点を解決するために鋭意研究した結果、本発明の「修飾SOD」は、SOD修飾に伴うSOD活性の低下は殆ど認められず、また、「修飾SOD」の血中半減期も顕著に長くなることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、デキストラン硫酸で修飾されたSODに関するものである。

以下、本発明について詳しく説明する。

本発明の「修飾SOD」は、SODと多糖類で

あるデキストラン硫酸とを化学的に結合させて得られたものであり、約90%の酵素活性保持率と約14時間の血中半減期を示すものである。

本発明の「修飾SOD」の作製に用いるSODとしては、ウシ、ヒトなどの動物、ホウレン草などの植物、及びセラチアなどの微生物に由来するものを挙げることができるが、ヒトに対する抗原性を考慮した医薬の「修飾SOD」としては、ヒトSODを用いることが好ましい。

そのようなヒトSODとしては、ヒト赤血球、胎盤などのSODを用いることもできるが、近年、遺伝子工学技術を応用して生産されたヒトSOD (例えば、特開昭61-111690など) を用いると、大量に安定した試料を得られるのでさらに好ましい。

本発明の「修飾SOD」の製造に用いるデキストラン硫酸としては、平均分子量が8,000のものが好ましい。

本発明の「修飾SOD」の製造におけるSODとデキストラン硫酸との結合割合は、1分子のS

OD当たり1~20分子がよく、好ましくは1~5分子がよい。

本発明の「修飾SOD」は、SODの官能基 (例えば、アミノ基またはカルボキシル基) とデキストランの官能基 (例えば、カルボキシル基、アミノ基または水酸基) とを利用して、好ましくはpH6.0~10、さらに好ましくはpH7.0~8.5で0.1~10%の濃度としたSODと活性化デキストランを結合させたものであり、例えば、

①デキストラン硫酸の水酸基に塩化シアヌルを反応させた後、これをそのトリアジン環を介してSODのアミノ基に結合させることによってSODとデキストラン硫酸とを結合させる方法

②デキストラン硫酸のカルボキシル基をN-ヒドロキシコハク酸とジシクロヘキシルカルボジイミドとを用いてエステルを導入し、これをSODのアミノ基に結合させることによってSODとデキストラン硫酸とを結合させる方法

③デキストラン硫酸の水酸基に無水コハク酸を用いてカルボキシル基を導入し、さらにそのカル

ボキシル基をN-ヒドロキシコハク酸とジシクロヘキシルカルボジイミドとを用いてエステルを導入し、これをSODのアミノ基に結合させることによってSODとデキストラン硫酸とを結合させる方法

などの方法で作製することができる。

このようにして、デキストラン硫酸とSODとを結合することによって得られる「修飾SOD」は、87%の酵素活性保持率を有するものである。

〔実施例〕

以下、本発明を実施例によって具体的に説明する。なお、これらの実施例は、本発明を例示するためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

本発明の実施例に示した「修飾SOD」の活性保持率は、大柳の示した方法 (Oyanagui, Y.; *Analytical Biochemistry*, 142, 290-296 (1984)) に準じてデキストランの修飾前後におけるSODの比活性を求め、その変化から求めた。

BE2) で生産し、精製して得られた5mgを2mlの0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解。) に溶解し、室温で穏やかに3時間攪拌した。その後、水に対して透析し、さらに凍結乾燥することによって43mgの「修飾SOD」を得た。

デキストラン硫酸はSOD 1分子当たり約3分子結合しており、その酵素活性保持率は87%であった。

実施例2

ウイスター系ラット (♂、体重は250±30g) の2匹に、生理食塩水に溶解した実施例1の「修飾SOD」溶液を、1匹当たりSODの蛋白質量として0.6mgづつ総頸静脈へ注入した。

注入から、2分、5分、15分、30分、60分、90分、120分、150分、180分経過時に0.4mlづつ採血し、その血漿中のSOD量を前記の大柳のSOD活性測定法で測定した。

「修飾SOD」の血流内半減期を求めるために、これらの血漿中のSODの相対活性を時間に対してプロットした結果、その半減期は、約14時間

また、デキストラン硫酸がSOD 1分子当たり何分子結合するかは、分析用の高速ゲル濾過カラムである3000PWおよび5000PW (いずれも、東ソー社製) を用いて「修飾SOD」の分子量を測定し、その分子量とSODの分子量とを比較することによって決定した。

実施例1

100mgのデキストラン硫酸 (平均分子量は8,000。シグマ社製。) を2mlのN, N-ジメチルホルムアミドに溶解し、これに10mgのN-ヒドロキシコハク酸イミドと20mgのジシクロヘキシルカルボジイミドを加え、室温で穏やかに15時間攪拌した。生じた沈澱物を濾過して除去し、得られた濾液に50mlのエチルエーテルを加え、生じた沈澱を濾過分取し、乾燥して70mgの活性化デキストラン硫酸を得た。

このようにして得られた50mgの活性化デキストランをヒトCu, Zn-SOD溶液 (特開昭61-111690号に示されたヒトCu, Zn-SOD生産菌 *E. coli* W3110 (pU

であった。

比較例1

未修飾のSODの血流内半減期を求めるために、実施例2の場合と同様にして、ウイスター系ラット (♂、体重は250±30g) を用いて血漿中のSODの相対活性及び相対濃度を時間に対してプロットした結果、その半減期は、相対活性及び相対濃度のいずれの場合においても約5分であった。

〔発明の効果〕

本発明の酵素活性保持率が高く、かつ血流内半減期が改善された「修飾SOD」は、静脈投与剤としてのSODの薬理効果を高めるものである。

特許出願人 宇部興産株式会社